动 物 学 研 究 1999, Feb. 20 (1): 12~16 CN 53-1040/Q ISSN 0254-5853
Zoological Research

制革污泥林业利用场水域的鳑鲏鱼外周血红细胞微核监测*

刘爱荣 王昌命 王友林
(西南林学院 昆明 650224)

摘 要 制革污泥施入林地后，检测小流域地表水、土壤渗出水对鳑鲏鱼（*Rhodeus sinensis*）外周血红细胞微核的诱变。结果表明：在实验范围内，没有诱发鳑鲏鱼血红细胞微核率增高，制革污泥林业利用系统是安全的；但鲜制革污泥浸出水可诱发鳑鲏鱼外周血红细胞微核率增高，故制革污泥如不加任何处理而随意堆放，会对环境造成污染。

关键词 制革污泥，林业利用，三价铬，鳑鲏鱼
中图分类号 Q959.468

制革污泥成分复杂，其中所含的三价铬和大量的氮素是主要污染物。林业利用后，三价铬大部分被土壤有机质、土壤粘粒吸附（曹仁林等，1982），少部分被林木和林下植被吸收，但不进入食物链。虽然丰富的氮素被林木吸收，可以增加林木产量（王昌命等，1995），但是，大批量的污泥进入林地是否会对当地的水环境造成潜在的危害？为此，我们在对小流域地表水和土壤渗出水进行常规化学监测的同时，进行了致突变性研究，以期为污泥林业利用系统的安全性评价提供细胞遗传学的依据。

微核试验(micronucleus test)是国内外公认的检测致癌剂、诱变剂的遗传毒理学方法之一。它能简便、快速、有效的进行致突变性筛选。不同水生生物的微核实验，中外学者已有大量的报道，国外学者用鲤鱼、草鱼(Al-sabti 等，1995)、鲶鱼(Das 等，1986)、东方荫鱼(*Umbra pygmaea*)(Hooftman 等，1982)、鲃(*Barbus plebejus*)(Minissis 等，1996)为实验材料；国内用罗非鱼(*Tilapia*)、鲫鱼(*Carassius auratus*)(刘爱华等，1984)、蝌蚪(*Bufo andrewsi*)(贺维顺等，1990)等为实验材料。分别对不同类型的水质、环境污染物进行了成功的微核实验。因此，我们以鳑鲏鱼(*Rhodeus sinensis*)为实验材料，将微核实验引入制革污泥林业利用系统的水质监测中。

1 材料与方法

1.1 污泥成分

制革污泥是昆明制革厂用硫化碱（Na_2S）脱毛，硫酸铬鞣革等工艺生产过程中的污水经污水处理厂处理后的沉淀物，在干化场停留半个月左右，自然脱水。其主要成分为：有机质 48.88%，全氮 3.24%，水解氮 50.70 mg/100 g，全磷 0.41%，水溶性硫化物 70~100 mg/kg，含盐量 5.90%，总铬 2 530 mg/kg，水溶性铬 7~10 mg/kg，含水率 70%~80%，pH 7~8。

1.2 实验区污泥负荷

水样分别取自大普吉林场实验区和黑玛山林场实验区。大普吉林场污泥负荷：杉木成林 200 t/hm^2，平施地表；圆柏、蓝桉新造林 140 t/hm^2，翻入土；均有防地表径流措施。黑玛山林场实验区原是造林不能成活的水平台式荒山。1986~1989 年用污泥造蓝桉林 31 hm^2，污泥负荷 95 t/hm^2。树木早已成材，并改善了小流域的生态环境。

1.3 受检水样

1993 年 5 月 16 日，在安宁黑玛山林场试验林下水塘里采集水样，作为小流域地表水试样；在黑玛山林场 1.5 m 深处土壤采渗出水为另一组受检水样；在大普吉杉木试验林下采集的水塘水，则是由

* 云南省应用基础研究基金资助项目
本文 1998-05-19 收到，1998-11-06 修回

上游泉水和地表水汇集而成。

晒泥场鲜污泥 1 kg，用二层纱布扎好浸于 4 L 饮用水中，浸泡 2 h，浸出水为一组受检水样。

用西南林学院符合卫生标准的饮用水（地下水）作为对照水样。

1.4 实验动物

鳑鲏鱼捕捞于昆明西郊花红洞附近的鱼塘中。体重约 0.3～0.5 g，开始前 10 天，把鱼饲养在饮用水中，每天上午投入磨细的金鱼饵料，每 3 天换 1 次水。

1.4.1 动物染毒　实验动物在受检水样中，饲养 1 周无明显的毒性效应时，定为合适的染毒浓度。染毒时间 30 d。

1.4.2 实验分组　实验动物分为 6 组，挑选健壮、活跃的个体随机分配到各个实验组，每组 20 只。未经稀释的安宁黑玛山试验林下水塘的水样；未经稀释的安宁黑玛山林场 1.5 m 处土壤渗出水水样；未经稀释的大普吉杉木实验林下水塘的水样。生活饮用水对照组；1/5 鲜污泥浸出水（20% 污水 + 80% 饮用水）；1/6 鲜污泥浸出水（16.6% 污水 + 83.4% 饮用水）。未经稀释的浸出水使鱼在染毒过程中全部陆续死亡。

1.5 标本制作

鱼在不同的水样中染毒 30 d，在处死前 6 h 将鱼转移到饮用水中。制片时将鱼取出放在纱布上，用手术剪剪断鱼的尾柄，把鱼血迅速滴在清洁的滴有小牛血清的载玻片上，与小牛血清混均后涂片并立即风干，以甲醇固定 15 min，用 10% 的 Giemsa（pH=6.98）染色 15 min，玻片冲洗干燥后镜检。

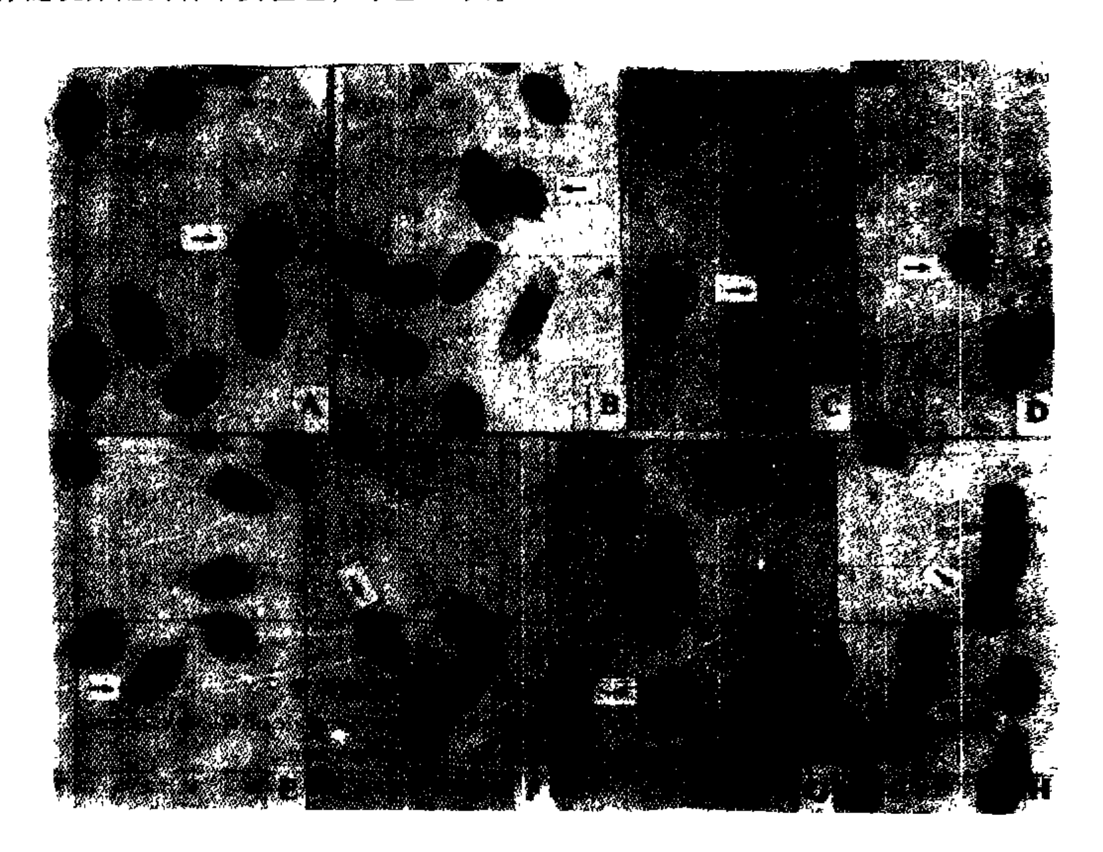


图 1　各实验点地表水、土壤渗出水（A～D）及鲜制革污泥浸出水（E～H）诱发的鳑鲏鱼外周血红细胞的微核和核异常

Fig.1　Micronuclei and other nuclear anomalies in blood erythrocyte of *Rhodeus sinensis* induced by exposure to surface water and percolating water in experimental sites (A－D) and oozing water of fresh tanning sludge (E－H)

A. 单微核（single micronucleus）；B. 小微核（small micronucleus）；C. 无丝分裂（amitosis）；D. 核内空泡（nuclear vacuole）；E 大微核（big micronucleus）；F. 双微核（double micronucleus）；G 核碎裂（karyorrhexis）；H 核质固缩（karyopyknosis）；A～H. 放大倍数 1 000 倍（all multiple times are 1 000）。

1.6 标本观察

鱼的外周血红细胞经 Giemsa 染色后，在显微镜下可观察到清晰的细胞质和细胞核，每组观察 7～8 条鱼，每条鱼平均观察 2 000 个细胞，记录带有微核的细胞数和核异常数，观察结果以千分率表示。

2 结 果

不同实验点的水样诱发鳑鲏鱼外周血红细胞的微核率和核异常率分别为：黑玛山水塘水 1.71‰ 和 2.36‰；黑玛山林场 1.5 m 土壤渗出水为 1.69‰ 和 2.25‰；大普吉水塘水为 1.63‰ 和 2.38‰；生活饮用水的对照为 1.63‰、2.44‰。在染毒 1 个月的情况下，3 个实验组与对照组相比，微核率无明显差异，核异常率与对照组相比也无明显差异（表 1），而且它们的核异常主要是无丝分裂、核空泡（图 1：C 、D）。

稀释后的鲜污泥浸出水，无论是 20% 污水组还是 16.6% 污水组，诱发鳑鲏鱼的微核率分别为 3.44‰、3.25‰，与对照相比，有显著差异（表 2）。这两组水样诱发的核异常，除无丝分裂、核空泡外，还出现大微核、双微核、核碎裂、核质固缩（图 1：E、F、G、H），对照组和污泥经林业利用后各实验点的水样中未出现异常。

表 1 不同实验点水样诱发鳑鲏鱼的微核和核异常

Table 1 Micronuclei and other nuclear anomalies in blood erythrocyte of *Rhodeus sinensis* induced by exposure to water samples in various experimental sites

组 别 (items)	观察动物数/条 (No. of experimental animals)	观察细胞/个 (No. of cells)	微核数/个 (No. of micronuclei)	核异常数/个 (No. of nuclear anomalies)	微核核异常总数/个 (No. of other nuclear anomalies)	微核率/‰ (frequency of micronucleus)	核异常率/‰ (frequency of nuclear anomalies)	X^2	P
黑玛山水塘水 (pool water of Heimashan)	7	14 000	24	33	57	1.71	2.36	0.006	>0.05
黑玛山实验林下 1.5 m 深处土壤渗出水 (oozing water of 1.5 m depth soil in Heimashan test foresty)	8	16 000	27	36	63	1.69	2.25	0.008	>0.05
杉木林下水塘水 (pool water under *Cunninghamia lancedata* forestry)	8	16 000	26	38	64	1.63	2.38	0.000	>0.05
对照水样 (control)	8	16 000	26	39	65	1.63	2.44		

表 2 鲜制革泥浸水诱发鳑鲏鱼微核和核异常

Table 2 Micronuclei and other nuclear anomalies in blood erythrocyte of *Rhodeus sinensis* induced by exposure to oozing water from fresh tanning

组 别 (items)	稀释倍数 (dilution times)	观察动物数/条 (No, of experimented animals)	观察细胞数/个 (No. of cells)	微核数/个 (No. of micronuclei)	核异常数/个 (No. of nuclear anomalies)	微核核异常总数/个 (total No. of) micronuclei and nuclear anomalies	微核率/‰ (frequency of micronucleus)	核异常率/‰ (frequency of nuclear anomalies)	X^2	P
浸出水 (oozing water)	5	8	16 000	55	55	110	3.44	3.44	11.000	<0.01
浸出水 (oozing water)	6	8	16 000	52	65	117	3.25	4.06	14.207	<0.01
对照 (control)	1	8	16 000	26	39	65	1.63	2.44		

3 讨 论

由于鱼的微核试验是一种监测水质污染程度的有效的生物学方法，制革污泥林业利用后在本试验区的范围内，没有引起鱼细胞遗传物质的明显变化，证明在本实验的污泥负荷下，制革污泥林地施用后，对小流域水环境未造成潜在的威胁，该系统是安全的。

用化学方法监测的铬含量无论是黑玛山实验点，还是大普吉实验点，水塘水铬的质量浓度均为 46.46×10^{-9}，而1.5 m处土壤渗出水铬质量浓度分别为 44.31×10^{-9}、45.42×10^{-9}，都低于国家规定的饮用水铬质量浓度 50×10^{-9} 的标准。

制革污泥中的铬，主要以三价态的形式存在。水溶性铬为7～10 mg/kg。两实验区的土壤均为山地红壤，pH值为5.4～5.5。林地施用污泥后，土壤pH值增加到5.9～6.0。据廖自基（1989）报道土壤溶液中pH值4时，三价铬溶解度降低，在pH值=5.5时全部沉淀。污泥中的水溶性铬进入土壤后溶解度更低。同时土壤胶体对三价铬的强烈吸附作用，也是随pH值的升高而增加（曹仁林等，1982)。林地施用污泥后，土壤有机质含量显著提高。土壤有机质不但对铬有吸附和螯合作用，而且能使可溶性的六价铬还原成难溶的三价铬（刘天齐等，1983；廖自基，1989)。8年的跟踪监测也表明：施用污泥林地土壤中的铬较难迁移。所以，地表水和土壤渗出水中的铬含量低，同时林下伴生植被凤尾蕨（*Pteris nervosa*）对铬有强烈吸收能力，是茅草（*Calamagrostis arundinacea*）吸收能力的3倍，非常有利于污泥中铬的去除。

土壤1.5 m深处渗出水的硝态氮含量为6.4 mg/L，比美国饮用水标准10 mg/L要低。化学方法监测的结果与生物监测的结果相符。

鲜污泥浸出水，稀释5、6倍后除微核率提高外，核异常率也明显升高，分别为3.44‰和4.06‰，与对照组2.44‰比有显著差异。在这组的核异常中出现了大微核、双微核、核碎裂，据贺维顺（1990）报道，大微核是被纺锤体毒剂损伤的细胞，在正常分裂的纺锤体受阻时滞留下来的染色体形成大的微核，诱变剂诱发染色体的断片只形成小微核。核碎裂为有毒有害化合物进入细胞后，作用于细胞核所致。由此可以认为鲜污泥浸出水即含染色体断裂剂，又含纺锤体毒剂及能进入细胞的有毒有害物质。并且微核实验有统计学意义。染色体断裂和/或纺锤体毒剂对人类和动物均有致突变、致畸变和致癌效应。所以制革污泥如果随意堆放，而不加任何处理，在被雨水淋溶和浸泡后，就会污染地表径流。

随着我国环境保护事业的发展，污水的处理率会大大提高，污泥的产量就会相应增加，污泥可以用于植树造林，进行资源化利用，特别是用于恢复已破坏了的生态环境。只要采取对污染物实行总量控制，选好树种等措施，就可达到消除污染和化害为利的目的。

致谢　本研究得到了中国科学院昆明动物所王蕊芳研究员的指导，特此致谢。

参 考 文 献

王昌命，木乔英，刘爱荣，1995. 制革污泥对杉木木材结构及杉木林下植被的影响. 植物资源与环境，4(2)：43－47. [Wang Chang-ming, Mu Qiao-ying, Liu Ai-rong, 1995. Study on the variation of the wood structure and floras under *Cunningnamia lanceolata* forestry affected by tanning sludges. *Journal of Plant Resources and Environment*, 4(2)：43－47.]

刘爱华，施立明，1988. 鱼类血细胞的微核测定. 动物学研究，6(1)：8－10. [Liu Ai-hua, Shi Li-ming, 1988. A micronucleus test in blood cells of fish *Zoological Research*, 6(1)：8－10.]

刘天齐，林　信，刘宜农，1982. 环境保护概论. 北京：高等教育出版社. 158～159. (Liu Tian-qi, Lin Xin, Liu Yi-nong, 1982. Environmental protection summary. Beijing: Publishing house for advanced education. 158－159.)

杨景辉，向　锋，钱　谊等译，1989. 工业和城镇污水土地处理系统手册. 北京：中国环境科学出版社. 41～42. (Reed S C, Crites R W, 1989. Handbook of land treatment systems for industrial and municipal wastes. 41－42.)

贺维顺，王蕊芳，1990. 蝌蚪（*Bufo bufo andrewsi*）血红细胞微核和核异常检测水质污染的研究. 动物学研究，11(1)：1～5. [He Wei-shun, Wang Rui-fang, 1990. Detection of water pollution by micronuclei and other nuclear anomalies of erythrocytes of tadpoles (*Bufo bufo andrewsi*). *Zoological Research*, 11(1)：1－5.]

曹仁林，赵玉钢，陶　战等，1982. 土壤中的铬与植物生长. 农业环境保护，2：15～18. (Cao Ren-lin, Zhao Yu-gang, Tao Zhan *et al*, 1982. Soil chromium and plant growth. *Agricultural Environment Protection*, 2：15－18.)

廖自基，1989 环境中微量重金属元素的污染危害与迁移转化. 北京：科学出版社. 148～150. (Liao Zi-ji, 1989. Pollutant damage migra-

tion and invertion of minor element of heavy metals in environment. Beijing: Science and Technology Publishing House. 148 - 150.)

Al-Sabti K, Metcalfe C D, 1995. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. *Mutation Res.*, **343**: 121 - 135.

Das R K, Nanda N K, 1986. Induction of micronuclei in peripheral erythrocytes of fish *Heteropneustes fossilis* by mitomycin C and paper mill effluent. *Mutation Res.*, **175**: 67 - 71.

Hooftman R N, de Raat W K, 1982. Induction of nuclear anomalies (micronuclei) in the peripheral blood erythrocytes of eastern mudminnow *Umbra phgmaea* by ethyl methanesulphonate. *Mutation Res*, **104**: 147 - 152.

Minissi S, Ciccotti E, Rizzoni M, 1996. Micronucleus test in erythrocytes of *Barbus plebeius* (Teleostei, Pisces) from two natural environments: a bioassay for the in situ detection of mutagens in freshwater. *Mutation Res.*, **367**: 245 - 251.

DETECTION OF WATER QUALITY FROM TANNING POLLUTED SITES WITH MICRONUCLEUS TEST ON ERYTHROCYTE OF *Rhodeus sinensis*

LIU Ai-rong WANG Chang-ming WANG You-lin
(*Southwest Forestry College, Kunming* 650224)

Abstract In the study, tanning sludge with Cr^{3+} two times higher than the national control standard for agricultural use was applied in forest and mutation of erythrocyte nucleus of *Rhodeus sinensis* caused by the water (both percolated water and surface water) from the site was examined. The results showed that the erythrocyte nucleus induced didn't increase in the test areas, and the forestry utilization of tanning sludge is safe, but oozing water for the tanning sludge can induce the increase of the red cell nucleus of *R. sinensis* blood. Thus careless disposal of tanning sludge can be very dangerous.

Key words Tanning sludge, Forestry utilization, Cr^{3+}, *Rhodeus sinensis*, Micronucleus